

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-023975

(43)Date of publication of application : 30.01.1996

(51)Int.Cl.

C12N 11/08

(21)Application number : 06-191035

(71)Applicant : NISSHINBO IND INC

(22)Date of filing : 20.07.1994

(72)Inventor : TAKENISHI SOICHIRO
SUZUKI OSAMU
IMASHIRO YASUO
TAKAHASHI IKUO
SASAKI NAOICHI
SHIYOUJI TOMOAKI
MATSUBAYASHI HIROKO

(54) MATERIAL FOR IMMOBILIZING BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE AND IMMOBILIZING METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a material composed of a substrate and a polymer compound supported on the substrate and having a carbodiimide group, capable of easily immobilizing a biologically active substance and useful e.g. as immobilized enzyme, antibody or antigen or a diagnostic having immobilized nucleic acid.

CONSTITUTION: This material for immobilizing a biologically active substance is produced by reacting a substrate consisting of a 96-hole microplate made of polystyrene with a diisocyanate compound such as 4,4'-dicyclohexylmethane diisocyanate and a diamine such as 1,4-diaminobutane, adding a solution of a polymer compound having a carbodiimide group and prepared by treating with a carbodiimidation catalyst such as 3-methyl-1-phenylphospholene-1-oxide and incubating the mixture at 60° C for 1hr. An aqueous solution of a biologically active substance such as enzyme, hormone, antigen, antibody, hapten, peptide or DNA is poured into the well and treated at 37° C for 2hr to immobilize the active substance to the material.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.04.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 8 - 2 3 9 7 5

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 1 月 30 日

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

C12N 11/08

2

審査請求 未請求 請求項の数 10 F D (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平 6 - 1 9 1 0 3 5

(22) 出願日 平成 6 年 (1994) 7 月 20 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 4 3 7 4

日清紡績株式会社

東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 1 番 1
1 号

(72) 発明者 竹西 壮一郎

東京都足立区西新井栄町 1 - 1 8 - 1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 鈴木 収

東京都足立区西新井栄町 1 - 1 8 - 1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(74) 代理人 弁理士 小林 雅人 (外 1 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的に活性な物質を固定するための材料及び固定するための方法

(57) 【要約】

【目的】 従来技術の難点を解消して、容易に活性物質を固定することができ、取り扱いも簡単な材料及びそのための方法を提供する。

【構成】 本発明の生物学的に活性な物質を固定するための材料は、基材と、該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなることを特徴とし、又、本発明の生物学的に活性な物質を固定するための方法は、基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基材と、該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなることを特徴とする生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 2】 カルボジイミド基を有する化合物が、基材上の全面或いはその一部に担持されている請求項 1 に記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 3】 カルボジイミド基を有する化合物が、皮膜として担持されている請求項 1 又は 2 に記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 4】 カルボジイミド基を有する化合物が、分子内に 2 以上 100 以下のカルボジイミド基を有するものである請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 5】 カルボジイミド基を有する化合物が、分子量が 1000 以上のものである請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 6】 カルボジイミド基を有する化合物が、分子量が 100000 以下のものである請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 7】 基材が、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子又はセラミックからなる群より選ばれたものである請求項 1 に記載の生物学的に活性な物質を固定するための材料。

【請求項 8】 基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とする生物学的に活性な物質を固定する方法。

【請求項 9】 生物学的に活性な物質が、蛋白質又は核酸等の生体高分子である請求項 8 に記載の生物学的に活性な物質を固定する方法。

【請求項 10】 生物学的に活性な物質が、酵素、ホルモン、抗体、抗原、ハプテン、ペプチド、合成ペプチド、DNA、合成 DNA、RNA、合成 RNA である請求項 9 に記載の生物学的に活性な物質を固定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物学的に活性な物質を固定するための材料及びそのための方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生物学的に活性な物質（以下、単に活性物質ということもある）、例えばタンパク、核酸、オリゴペプチド、オリゴヌクレオチド等を不溶性の担体に固定させたものは、その活性を利用するために有用であり、例えば、固定化酵素の生理化学工業的利用、抗体或いは抗原固定担体の免疫学的利用、核酸固定担体の診断

薬としての利用等を挙げることができる。

【0003】そのため、活性物質を固定化する種々の方法が公表されていて、例えば酵素では、

1. ジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による基材結合法や Ugi 反応による基材結合法等のような酵素を架橋剤や縮合剤等を用いて化学結合させる方法（「固定化酵素」〔千畑一郎編、講談社サイエンティフィック（1986）〕第 9 - 41 ページ参照）

2. イオン結合で固定する方法（「固定化酵素」第 41 - 43 ページ参照）

3. 物理吸着で固定する方法（「固定化酵素」第 43 - 45 ページ参照）等が知られている。

【0004】又、核酸では、

1. 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定（P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, Biochem. J., 278, 735-740 (1991) 参照）等のような修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法（尚、この範疇に属する他の方法については、Soren R. R. Mette R. L. Svend E. R. Anal. Biochem., 198, 138-142 (1991), Jonathan N. K. Joseph L. W. Joseph P. D. Rachel E. M. Mary C. Eugene L. B. Nucleic Acids Res., 15, 2891-2909 (1987), Allan J. M. Jeffrey R. B. Terence W. P. Biochem. J., 191, 276-279 (1990), J. A. Running, M. S. Ureda, Biotechniques, 8, 276-279 (1990) 等に記載されている。）

2. ニトロセルロース又はナイロン膜状に UV 照射或いは加熱処理により核酸を吸着固定（J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2. 109-2.113 and page 9.36-9.46）したり、マイクロプレート上に物理吸着させて固定（G. C. N. Parry, A. D. B. Malcolm, Biochem. Soc. Trans., 17, 230-231 (1989)）する等の物理吸着で固定する方法等が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のような従来方法には難点のあることが指摘されていた。例えば、化学結合による方法では、特殊試薬が必要で、それらの中には、例えばアジド、イソシアナートや NaBH₃CN 等のような有毒物質が含まれるばかりか、例えばペプチド結合を介して固定化しようとする場合は、活性物質或いは基材のどちらか一方にアミノ基を、残る片方にはカルボキシル基を導入する必要がある、更に、導入された官能基同士を縮合試薬で処理して固定化する行程を経なければならないというように、操作が複雑となることを避けられない。

【0006】又、化学結合では、例えばグルタルアルデヒドを架橋剤として使用するには、基材と活性物質の双方にアミノ基が存在しなければならないというように、

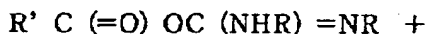
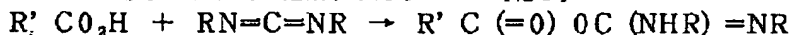
基材自体に官能基が必要で、基材の選択が必要となる結果、固定に適した基材の選択が困難になり、加えて、例えば天然のDNAや修飾基を持たない合成DNA等の、反応性の乏しい官能基（末端リン酸基、末端ヒドロキシル基等）しか有しないものについては、化学反応による方法を用いることが困難であるというように、活性物質に活性官能基が無い場合は固定できないという難点がある。

【0007】一方、物理吸着には、基材の吸着性能に固定化量が左右されたり、吸着した活性物質が脱離しやすく、活性物質が低分子（オリゴマー）の場合、基材との相互作用が弱いため吸着しにくいという難点があり、更に、核酸をナイロン膜やニトロセルロース膜に吸着固定する場合は、吸着密度も結合力も高いが、どちらの膜も強度がなく、破れやすいため、取り扱いに必要以上の注意が必要となってしまう。

【0008】本発明は上述した従来技術の難点を解消して、容易に活性物質を固定することができ、取り扱いも簡単な材料及びそのための方法を提供するためになされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため



しかしながら、これら低分子のカルボジイミド誘導体は、縮合剤として開発されてきた試薬であって、溶剤に対する溶解性が付与されており、基材に適用し、該基材表面に担持させる使用目的に関しては、脱離しやすく、実用上使用できないことが判明した。そこで、本発明の発明者らは、カルボジイミド基を分子内に含む高分子のカルボジイミド化合物に着目し、鋭意研究を続けた結果、このようなカルボジイミド化合物が活性物質との反応性を有しているばかりでなく、様々な種類の基材との接着性が良いことを見出し、本発明の完成に至った。

【0012】以下に本発明を詳細に説明する。

【0013】本発明で使用される基材としては、活性物質を固定するための支持体としての役割を果たすものであって、基本的には、水或いは溶剤又はそのどちらにも不溶性で且つ常温若しくはその付近の温度範囲内（0～100℃）で固体であるもの、例えば、プラスチック、ガラス、金属、カーボン、天然高分子、セラミックが適している。

【0014】更に具体的には、

プラスチック；ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹

に本発明が採用した生物学的に活性な物質を固定するための材料の構成は、基材と、該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなることを特徴とするものであり、上記目的を達成するために本発明が採用した生物学的に活性な物質を固定するための方法の構成は、基材及び該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とするものである。

【0010】即ち、低分子カルボジイミド誘導体、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドやジ-p-トルオイルカルボジイミドは、エステル及びペプチド等の合成における脱水縮合剤として従来より広く使用されている。これらのカルボジイミド誘導体は、以下の反応式に示すように容易にカルボン酸と付加体を形成し、更にこの付加体がアルコール、アミン、カルボン酸等と尿素誘導体を放しつつ縮合し、それぞれ相当するエステル、アミド、酸無水物を生成するので、このような低分子カルボジイミド誘導体を活性物質の固定に使用することも考えられた。

【0011】

【化1】

30 脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミド及びアクリル樹脂等
無機高分子；ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、及びグラファイト等
金属；金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、バ
ラマグネット及びアバタイト等の常温固体金属
天然高分子；セルロース、セルロース誘導体、キチン、
キトサン及びアルギン酸等
セラミック；アルミナ、シリカ、炭化ケイ素、窒化ケイ
40 素及び炭化ホウ素等
等を例示することができる。

【0015】上記基材の形状としては、例えば、フィルム、板、粒子、成型品（ビーズ、ストリップ、マルチウエルプレートのウエル、ストリップ又は個々の単位、チューブ、メッシュ、発泡フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライド及び細胞培養容器）を挙げることができ、又、その大きさについては、当然であるが特に制限はない。

【0016】一方、本発明で使用するカルボジイミド基を有する高分子化合物（以下、単にカルボジイミド化合

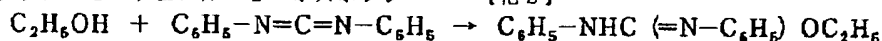
物ということがある)としては、例えば、特開昭51-61599号公報に開示されている方法やL. M. Alberinoらの方法(J. Appl. Polym. Sci., 21, 190 (1990))或いは特開平2-292316号公報に開示されている方法等によって製造することができるポリカルボジイミドを挙げることができる。即ち、有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒の存在下に製造することができるものである。

【0017】上記有機ポリイソシアネート化合物としては、例えば、2, 4-トリレンジイソシアネート、2, 6-トリレンジイソシアネート、2, 4-トリレンジイソシアネートと2, 6-トリレンジイソシアネートの混合物、粗トリレンジイソシアネート、粗メチレンジフェニルジイソシアネート、4, 4', 4"-トリフェニルメチレントリイソシアネート、キシレンジイソシアネート、ヘキサメチレン-1, 6-ジイソシアネート、リレンジイソシアネート、水添メチレンジフェニルジイソシアネート、m-フェニルジイソシアネート、ナフチレン-1, 5-ジイソシアネート、4, 4'-ビフェニレンジイソシアネート、ジフェニルメタン-4, 4'-ジイソシアネート、3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニルジイソシアネート、3, 3'-ジメチルジフェニルメタン-4, 4'-ジイソシアネート、イソホロンジイソシアネートやこれらの混合物を挙げることができる。

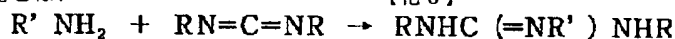
【0018】又、上記ポリカルボジイミドは、その分子量をモノイソシアネートの一種以上を用いることにより、重縮合をある段階で停止させる等して調整しつつ製造されたものでもよい。このようにしてポリカルボジイミドの末端を封止してその分子量を制御するためのモノイソシアネートとしては、フェニルイソシアネート、(オルト、メタ、パラ)-トリルイソシアネート、ジメチルフェニルイソシアネート、シクロヘキシルイソシアネート、メチルイソシアネート等を例示することができる。

【0019】又、容易に類推されることであるが、この他にも末端封止剤としては、-OH、-NH₂、-COOH、-SH、-NHアルキル末端を有する化合物約1モルと、芳香族ジイソシアネート2モルとの反応によって簡便に製造できるイソシアネート末端化合物から誘導されるものでもよい。

【0020】上記有機ポリイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒としては、種々のものを例示することかできるが、1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン



のように進行し、アミノ基とは、



のように進行する (Frederick Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, Chemical Reviews, 67, 117-135 (1967) 及び Andrew

-1-オキシド、1-エチル-2-ホスホレン-1-オキシドやこれらの3-ホスホレン異性体等が収率その他の面で好適である。

【0021】上記ポリカルボジイミドの製造は、無溶媒又は非反応性の有機溶媒中で行うものであり、本発明ではこれらにより製造したワニス状或いは固体状(粉末)のポリカルボジイミドの一種又は混合物をカルボジイミド化合物の一例として用いることができる。尚、これらのポリカルボジイミドは、基材との結合性を増加させるために、部分的に架橋するようにしてもよい。

【0022】他のカルボジイミド化合物、例えば特開昭63-172718号公報及び特開昭63-264128号公報に記載されるような、分子構造内にポリオキシエチレン鎖を付加してなる親水性を付与されたタイプのカルボジイミド化合物も本発明で使用することができる。

【0023】いずれのタイプであっても、本発明で使用するカルボジイミド高分子化合物は、その分子中に2以上100以下のカルボジイミド基を有しているものが好ましく、このカルボジイミド高分子化合物においてカルボジイミド基の数が2未満、即ち1の場合は生物学的に活性な物質を固定する能力に欠け、又、逆にカルボジイミド基の数が101以上の場合は性能面では問題はないが、粘度が高すぎたり、溶液とすることができない場合があり、基材上に担持させる際の取り扱い性が悪化してしまう。

【0024】又、本発明で使用するカルボジイミド高分子化合物の分子量の範囲としては、1000以上であり、100000以下であることが好ましい。

【0025】尚、例えば、前記有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒の存在下に製造されたポリカルボジイミドの中には、分子量が1000に満たないものも存在するが、このようなポリカルボジイミドについては、ポリカルボジイミドの両末端に、ウレア結合又はウレタン結合を介して、ポリアルキレン、ポリオキシアルキレン、ポリウレタン、ポリアミド等を導入し、分子量を前記範囲に調整すればよい。

【0026】すでに説明したように、上記カルボジイミド高分子化合物におけるカルボジイミド基の反応性は高く、アルコール、アミン、チオール、フェノール、カルボン酸等の有するほとんどの活性水素基と反応するのであり、前記カルボジイミド誘導体とカルボン酸との反応以外の反応を示せば、例えばアルコールとは、

【化2】

【化3】

Williams, Ibrahim T. Ibrahim, Chemical Reviews, 81, 599-606 (1981)参照)ので、本発明は、このような

反応性を利用して活性物質を固定するのである。

【0027】本発明の活性物質を固定するための材料は、上記基材と、該基材上に担持された、上記カルボジイミド化合物よりなり、該カルボジイミド化合物の前記基材に対する高い接着性を利用して担持させたものである。尚、ここでいう「担持」とは、水或いは溶媒中で脱離しないことを意味する。

【0028】カルボジイミド化合物は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、又、その一部において担持されていてもよく、その代表的な態様は皮膜である。

【0029】前記基材上に前記カルボジイミド化合物を担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタンプ、蒸着、フィルムコーターを用いたコーティング等の公知の手段を採用することができる。

【0030】このようにして得られた本発明の活性物質を固定するための材料は、カルボジイミド化合物の反応性を利用して、様々な活性物質を固定することができるものであり、このような活性物質としては、蛋白質又は核酸等の生体高分子を、更に具体的には、酵素、ホルモン、抗体、抗原、ハプテン、ペプチド、合成ペプチド、DNA、合成DNA、RNA、合成RNAを例示することができる。

【0031】上記本発明の活性物質を固定するための材料により、上記のような活性物質を固定するには、当該材料と活性物質とを接触させればよく、両者の接触は、活性物質の活性が維持されるように、水或いはバッファ中で行うことが好ましく、又、接触の際の温度としては、やはり活性物質の活性が損なわれないように、0～100℃とすることが好ましい。

【0032】このようにして得られた固定された活性物質は、該活性物質が基材に対し非常に強固に担持されたものであり、イムノアッセイの分野で広く使われている洗浄法（界面活性剤を用いた洗浄法）によっても脱離することがなく、固定化酵素の生理化学工業的利用、抗体或いは抗原固定担体の免疫学的利用、核酸固定担体の診断薬としての利用等の広い利用分野を有している。

【0033】尚、現段階では、活性物質の担持される機構（結合様式）は不明であるが、Frederick Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, Chemical Reviews, 67, 117-135 (1967)に開示されているような、化学結合と物理吸着の両作用によるものと推測される。

【0034】以下に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

【0035】

【実施例】

カルボジイミド化合物溶液1の製造例

4, 4'-ジクロロヘキシルメタンジイソシアネート 117.9g とシクロヘキシルイソシアネート 12.5g をカルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニル-

2-ホスホレン-1-オキシド）1.3g と共に窒素雰囲気下、180℃で4日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物（重合度10、数平均分子量2400）を得た。この10gを取り、メタノール100mlに分散溶解させ、カルボジイミド化合物溶液1を得た。

【0036】カルボジイミド化合物溶液2の製造例

イソホロンジイソシアネート 19.9g とn-ブチルイソシアネート 2.0g をカルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド）0.2g と共に窒素雰囲気下、180℃で3日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物（重合度10、数平均分子量1900）を得た。この10gを取り、ジクロロメタン100mlに溶解し、カルボジイミド化合物溶液2を得た。

【0037】カルボジイミド化合物溶液3の製造例

2, 4-トリレンジイソシアネート/2, 6-トリレンジイソシアネートの混合物（混合割合＝80:20）78.4g とフェニルイソシアネート 11.9g とをテトラクロロエチレン 61.5g 中で、カルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド）0.9g と共に窒素雰囲気下、75℃で24時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液3（重合度10、数平均分子量1500）を得た。

【0038】カルボジイミド化合物溶液4の製造例

4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート 112.6g とフェニルイソシアネート 11.9g とをテトラヒドロフラン 92.2.7g 中で、カルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド）1.2g と共に窒素雰囲気下、75℃で16時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液4（重合度10、数平均分子量2300）を得た。

【0039】カルボジイミド化合物溶液5の製造例

m-тетраметилкислирендиисоцианет 700g とカルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド）14g を窒素雰囲気下、180℃で12時間反応させ、イソシアネート末端тетраметилкислиренкарбодиимид（重合度＝3）を得た。次いで、得られたカルボジイミド 74.6g と重合度6のポリ（オキシエチレン）モノメチルエーテル 63.6g を100℃で48時間反応させた。これを10g取り、50℃で蒸留水 90g を徐々にカルボジイミド化合物溶液5（数平均分子量1400）を得た。

【0040】カルボジイミド化合物溶液6の製造例

4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート 162g をテトラヒドロフラン 88.6g 中でカルボジイミド化触媒（3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド）0.33g と共に窒素雰囲気、リフラックス下で7時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液6（重合度60、数平均分子量13000、ポリマー濃度15重量%）を得た。

【0041】カルボジイミド化合物溶液7の製造例
m-テトラメチルキシリレンジイソシアネート700gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)14gを窒素雰囲気下、180℃で18時間反応させ、イソシアネート末端テトラメチルキシリレンカルボジイミド(重合度=4)を得た。次いで、得られたカルボジイミド50.2gと2-ジメチルアミノエタノール8.9gを80℃で24時間反応させた後、p-トルエンスルホン酸メチル18.6gを加え1時間反応させた。これに蒸留水699.3gを徐々に加え、カルボジイミド化合物溶液7(数平均分子量1600、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0042】カルボジイミド化合物溶液8の製造例
イソホロンジイソシアネート20gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)0.2gを窒素雰囲気下、180℃で18時間反応させ、イソシアネート末端イソホロンカルボジイミド(重合度=4)を得た。次いで、得られたカルボジイミド7.56gと3-ジメチルアミノ-n-プロピルアミン2.04gを80℃で1時間反応させた後、p-トルエンスルホン酸メチル3.72gを加え、1時間反応させた。これに蒸留水120gを徐々に加え、カルボジイミド化合物溶液8(数平均分子量1400、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0043】カルボジイミド化合物溶液9の製造例
4,4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート117.9gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)1.2gを窒素雰囲気下、180℃で8時間反応させ、イソシアネート末端ジシクロヘキシルカルボジイミド(平均重合度=2.4)を得た。次いで、得られたカルボジイミド7.85gと重合度約6のポリ(オキシエチレン)モノメチルエーテル5.92gを100℃で48時間反応させた。これに蒸留水124gを徐々に加え、カルボジイミド化合物溶液9(数平均分子量1300、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0044】カルボジイミド化合物溶液10の製造例
4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート15gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)0.1gをテトラヒドロフラン145g中、窒素雰囲気下、75℃で8時間反応させ、イソシアネート末端ジフェニルメタンカルボジイミド(重合度=5)を得た。次いで、得られたカルボジイミド溶液に重合度約10のポリ(オキシエチレン)モノメチルエーテル9.44gを加え、75℃で48時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液10(数平均分子量2100、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0045】カルボジイミド化合物溶液11の製造例
2,4-トリレンジイソシアネート/2,6-トリレンジイソシアネートの混合物(混合割合=80:20)1

3.9gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)0.1gをテトラヒドロフラン150g中、窒素雰囲気下、75℃で8時間反応させ、イソシアネート末端トリレンカルボジイミド(重合度=4)を得た。得られたカルボジイミド溶液にヒドロキシプロパンスルホン酸ナトリウム1.62gを加え、75℃で24時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液11(数平均分子量1000、ポリマー濃度10重量%)を得た。

10 【0046】カルボジイミド化合物溶液12の製造例
4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート24gと平均分子量400のポリエチレングリコール20gをテトラヒドロフラン440gに加え反応させた。次に、カルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)0.2gを加え、窒素雰囲気下、75℃で48時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液12(数平均分子量5300、ポリマー濃度10重量%)を得た。

20 【0047】カルボジイミド化合物溶液13の製造例
4,4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート52.4gと1,4-ジアミノブタン8.8gをテトラヒドロフラン620gに加え反応させた。次に、カルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)0.5gを加え、窒素雰囲気下、75℃で48時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液13(数平均分子量3700、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0048】実施例1

(1) マイクロプレート上へのDNAオリゴマーの固定。
ファージベクターM13mp18のlac'Z領域中のマルチクローニングサイトの中から29baseを選定し、DNA合成機(MILLIPORE社製、Cyclone Plus DNA/RNA Synthesizer)により、以下の塩基配列のDNAを合成した。この合成DNAの5'末端には、選択的にストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲートタンパクを結合するために、ピオチンフォスフォルアミダイト(MILLIPORE社製)を組み込んだ。尚、ピオチンフォスフォルアミダイトは、Bで示した。

塩基配列1

5' BGA GGA TCC CCG GGT ACC
GAG CTC GAA TTC 3'

40 【0049】ポリスチレン製の96穴マイクロプレート
のウェル5穴にカルボジイミド化合物溶液1の0.1mlを加え、60℃で1時間インキュベートした。ウェルをエタノールでよく洗浄し、60℃で30分乾燥した。ピオチン標識されたDNAオリゴマー溶液(上記塩基配列1の10pmol/ml濃度の水溶液)0.1mlをポリカルボジイミドで被覆されたウェルと被覆処理をしていないウェル(ブランク)のおのおの5穴づつに

(試料番号 1 ~ 5) に分注し、37℃で2時間固定した。固定化後、滅菌水 0.3 ml で 5、6 回よく洗浄し、60℃で30分乾燥した。保存は、冷暗所乾燥雰囲気で行った。

【0050】(2) 検出

ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲートのウェル表面への非特異的吸着を押さえる(ブロッキングする)ため、DNA 固定化処理を施したウェルに、3% BSA 溶液 (3% Bovine Serum Albumin (BSA) / 0.2M NaCl / 0.1M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) 0.2 ml を加え、37℃で30分インキュベートした。BSA 溶液を吸引除去後、ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 (125pg/ml Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (CLONTECH製) / 0.2M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) 0.1 ml を加え、室温で30分インキュベートした。ついで、洗浄液 1 (0.2M NaCl / 0.1M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) 0.3 ml で 10 分づつ 3 回洗浄し、更に、洗浄液 2 (0.1M NaCl / 0.1M Tris HCl, pH 9.5 / 50ml MgCl₂) 0.3 ml で 1 回洗浄した後、基質溶液 (1mg p-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate / 0.1M NaCl / 0.1M Tris HCl, pH 9.5 / 50ml MgCl₂) 0.1 ml を加え、室温で2時間発色反応させた。2時間経過後、各ウェル中の溶液の吸光度を分光光度計を用いて測定した。その結果を表 1 に示す。

【0051】実施例 2

(1) マイクロプレート上へのストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲートの固定
ポリスチレン製の 96 穴マイクロプレートのウェル 5 穴 (試料番号 6 ~ 10) にカルボジイミド化合物溶液 1 の 0.1 ml を加え、60℃で1時間インキュベートした。ウェルをメタノールでよく洗浄し、ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 (125pg/ml Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (CLONTECH製) / 0.2M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) 0.1 ml を加え、37℃で30分インキュベートした。

【0052】(2) 検出

洗浄液 1 (0.2M NaCl / 0.1M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) 0.3 ml で 10 分づつ 3 回洗浄し、更に、洗浄液 2 (0.1M NaCl / 0.1M Tris HCl, pH 9.5 / 50ml MgCl₂) 0.3 ml で 1 回洗浄した後、基質溶液 (1mg p-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate / 0.1M NaCl / 0.1M Tris HCl, pH 9.5 / 50ml MgCl₂) 0.1 ml を加え、室温で2時間発色反応させた。2時間経過後、各ウェルについて視覚による発色判定を行うと共に、各ウェル中の溶液の吸光度を分光光度計を用いて測定した。その結果を表 2 に示す。

【0053】実施例 3

基材としてのポリスチレン製マイクロプレート (SUMILO

N ELISA 用 96 F プレート type C (住友ベークライト社製、表面: カルボキシ基) と、カルボジイミド化合物溶液 5、7、8、9 を用い、実施例 1 と同様の試験を行った。結果を表 1 に示す。

【0054】実施例 4

基材としての、実施例 3 で使用したものと同様のポリスチレン製マイクロプレートと、カルボジイミド化合物溶液 5、7、8、9 を用い、実施例 2 と同様の試験を行った。結果を表 1 に示す。

【0055】実施例 5

実施例 1 と同様の方法により、カルボジイミド化合物溶液 1 を被覆したマイクロプレートに 0.01M の HEPES (pH 7.0) で希釈した ACTH ペプチドオリゴマー (ペニンシュラ社製) 溶液 (1mg/ml) 0.2 ml を分注し、軽く浸透後、溶液を捨て、ペーパータオルで軽くふき、未固定の ACTH ペプチドオリゴマーを排除した。この操作を 3 回繰り返した。ブロッキング液 (10% BSA を含む 0.01M の HEPES, pH 7.0) 0.2 ml をウェルに分注し、37℃で30分反応させた。ウェルの溶液を捨て、0.01M の HEPES (pH 7.0) 0.2 ml を分注し、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。坑 ACTH マウス IgG (CYMBUS バイオサイエンスリミテッド社製、1mg/ml の 50% グリセロール溶液) を 0.01M の HEPES (pH 7.0) で 100 倍に希釈した溶液 0.1 ml をウェルに分注し、室温で30分反応させた反応後、溶液を捨て、0.01M の HEPES (pH 7.0) 0.2 ml を分注し、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。坑マウス IgG ヤギ IgG-アルカリフォスファターゼコンジュゲート (Kirkegaard & Perr ラボラトリー社製、1mg/ml の 50% グリセロール溶液) を 0.01M の HEPES (pH 7.0) で 1000 倍に希釈した溶液 0.01 ml を加え、室温で30分反応させた。反応後、溶液を捨て 0.01M の HEPES (pH 7.0) 0.2 ml を分注し洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。ウェルに基質溶液 (50mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0)、5mM MgCl₂、5mM p-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム) 0.01 ml を加え、30℃で1時間反応させた。0.1N 水酸ナトリウム水溶液 0.2 ml を加え、反応を停止させた。吸光度計で 405 nm の吸収値を測定した。同様の操作を 5 個のウェル (試料番号 1 ~ 5) で行った。結果を表 1 に示す。

【0056】実施例 6

ポリスチレンビーズ [Poly(styrene-2% divinyl benzene), 200-400mesh] 5g をカルボジイミド化合物溶液 1、2、3、4、6、10、11、12、13 の希釈液 (THF で 10 倍希釈) 100 ml に 30 分間浸漬した後、60℃で3時間乾燥し、カルボジイミド化合物被覆ビーズを得た。このカルボジイミド化合物被覆ビーズと

被覆を施していないビーズ（ブランク）のそれぞれ 1 g を、実施例 1 で用いたビオチン標識 DNA オリゴマー溶液 $1 \mu\text{g}/10 \text{ ml}$ に 37°C で 2 時間浸漬後、ビーズをガラスフィルターでろ別し、蒸留水 500 ml で洗浄、乾燥し、DNA 固定ビーズを得た。次いで、実施例 1 と同様、ブロッキング、ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート処理、洗浄を行ない、基質溶液 3 ml に加え、2 時間後の溶液の 405 nm の吸光度を分光光度計を用いて測定した。その結果を表 1 に示す。

【0057】実施例 7

実施例 6 と同様の方法で作成したカルボジイミド化合物被覆ビーズと被覆を施していないビーズ（ブランク）のそれぞれ 1 g を、実施例 2 で用いたストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 3 ml に室温で 2 時間浸漬後、ビーズをガラスフィルターでろ別し、蒸留水 500 ml で洗浄、乾燥し、ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート固定ビーズを得た次いで、実施例 2 と同様に洗浄を行い、基質溶液 3 ml に加え、2 時間後の溶液の 405 nm の吸光度を分光光度計を用いて測定した。その結果を表 1 に示す。

【0058】実施例 8

(1) PET フィルム上への DNA オリゴマーの固定
ポリエチレテレフタレート (PET) フィルムを $1 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ の長方形に切断し、このフィルム上にカルボジイミド化合物溶液 1 ~ 4、6、10 ~ 13 の各々 0.5 ml をスピンコーターで被覆した。このフィルムを 80°C で 30 分乾燥し、カルボジイミド化合物で被覆したフィルムを得た。ビオチン標識された DNA オリゴマー溶液（塩基配列 1 の $100 \text{ pmol}/\text{ml}$ 濃度水溶液） $1 \mu\text{l}$ をカルボジイミド化合物で被覆したフィルムと被覆処理を施していないフィルム（ブランク）におおの 3 ドットずつプロットし、室温で 10 分間固定した。

【0059】(2) 検出

検出は、CLONTECH 社の GENE-TECT Detection System を用い、操作は、その Detection Protocol に従った。以下に説明する。

(a) ブロッキング

ハイブリバックに DNA 固定フィルムを入れ、3% BSA 溶液 2 ml を加え、 37°C 、30 分インキュベートする。

(b) ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲートの結合 BSA 溶液を吸引除去後、ストレプトアビジナルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 1 ml を加え、室温、30 分インキュベートする。

(c) 洗浄

洗浄液 1 ($0.2 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, 0.05% Triton-X-100) の 2 ml で 10 分ずつ 3 回洗浄する。

(d) バッファー交換

洗浄液 2 ($0.1 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, $\text{pH} 9.5/50 \text{ ml MgCl}_2$) の 2 ml で 1 回置換する。

(e) 発色操作

基質溶液（洗浄液 2 ($0.1 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, $\text{pH} 9.5/50 \text{ ml MgCl}_2$) の 1 ml + BCI P 溶液 (50 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/ 900 ml Dimethylformamide) $3.2 \mu\text{l}$ + NBT 液 (50 mg Nitro Blue Tetrazolium/ 1.8 ml 70% methanol) $6.4 \mu\text{l}$) 1 ml を加え、室温の暗所で 3 時間発色反応させる。

10 (f) 結果

結果を表 2 に示す。

【0060】実施例 9

(1) PET 上へのストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートの固定

実施例 3 と同様の方法でカルボジイミド化合物溶液 1 ~ 4、6、10 ~ 13 を被覆したフィルムに、ストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (125 pg/ml Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (CLONTECH 製/ 0.2 M Tris HCl , 0.05% Triton-X-100) をカルボジイミド化合物で被覆したフィルムと被覆処理を施していないフィルム（ブランク）におおの 3 ドットずつプロットし、室温で 10 分間固定した。

【0061】(2) 検出

(a) 洗浄

洗浄液 1 ($0.2 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, 0.05% Triton-X-100) の 2 ml で 10 分ずつ 3 回洗浄した。

(b) バッファー交換

洗浄液 2 ($0.1 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, $\text{pH} 9.5/50 \text{ ml MgCl}_2$) の 2 ml で 1 回置換した。

30 (c) 発色操作

基質溶液（洗浄液 2 ($0.1 \text{ M NaCl}/0.1 \text{ M Tris HCl}$, $\text{pH} 9.5/50 \text{ ml MgCl}_2$) の 1 ml + BCI P 溶液 (50 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/ 900 ml Dimethylformamide) $3.2 \mu\text{l}$ + NBT 液 (50 mg Nitro Blue Tetrazolium/ 1.8 ml 70% ethanol) $6.4 \mu\text{l}$) 1 ml を加え、室温の暗所で 3 時間発色反応させた。

(d) 結果

結果を表 2 に示す。

【0062】実施例 10

40 (1) ガラス上への DNA オリゴマーの固定

実施例 3 と同様の方法でガラス表面にカルボジイミド化合物溶液 1 ~ 4、6、10 ~ 13 を被覆し、実施例 3 と同様の方法により DNA を固定した。

(2) 検出

実施例 3 と同様の方法により固定 DNA を検出した。結果を表 2 に示す。

【0063】実施例 11

(1) ガラス上へのストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートの固定

50 実施例 3 と同様の方法でガラス表面に 10% カルボジイ

ミド化合物溶液1~46、10~13を被覆し、実施例4と同様の方法によりストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを固定した。

(2) 検出

実施例4と同様の方法により固定ストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを検出した。結果を表2に示す。

【0064】実施例12

(1) 銅板上へのDNAオリゴマーの固定

実施例3と同様の方法で銅板表面に10%カルボジイミド化合物溶液1~4、6、10~13を被覆し、実施例3と同様の方法によりDNAを固定した。

(2) 検出

実施例3と同様の方法により画定DNAを検出した。結果を表2に示す。

【0065】実施例13

(1) 銅板上へのストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートの固定

実施例3と同様の方法で銅板表面に10%カルボジイミド化合物溶液1~4、6、10~13を被覆し、実施例4と同様の方法によりストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを固定した。

(2) 検出

実施例4と同様の方法により固定ストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを検出した。結果を表2に示す。

【0066】尚、上記実施例8~13について、各々の基材上の被覆厚みを測定したところ0.5~1μmであった。又、各々の被覆表面の赤外吸収を測定したところ2100cm⁻¹付近のカルボジイミドに特有の吸収があり、基材上の被覆はカルボジイミド化合物であることが確かめられた。

【0067】実施例14

ろ紙(Whatman社製、ろ紙番号42)をカルボジイミド溶液1、2、3、4、6、11、10、12、13の希釈液(THFで20倍希釈)に10秒間浸漬した後、60℃、30分間乾燥し、カルボジイミド化合物被覆ろ紙を得た。このろ紙に、実施例3と同様の方法によりDNAを固定し、検出した。結果を表2に示す。

【0068】実施例15

実施例14と同法により作成したカルボジイミド化合物被覆ろ紙に、実施例4と同法でストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートを固定し検出した。結果を表2に示す。

【0069】実施例16

マイクロフィルター(富士フィルム社製、FRタイプ、孔径0.7μm)をカルボジイミド化合物溶液1、2、3、4、6、10、11、12、13の希釈液(THFで20倍希釈)10秒間浸漬した後、60℃で30分間乾燥し、カルボジイミド化合物ブロックティングメンブ

レンを得た。このメンブレンを用い、サザンハイブリダイゼーションをMolecular Cloning 9.31-9.51(Molecular Cloning, a laboratory manual second edition, Cold Spring Harbor Laboratory press 1989)に従って行った。

【0070】試験材料は、DNA分子量マーカー(宝酒造社製、DNA MW Standard Markers, λ-Hind III Digest) 1μgを1%アガロースゲル電気泳動で分画した後このメンブレンにキャピラリトランスファーした。次いで、λDNA(宝酒造社製、bacteriophage λcl 857 Sams)を基に、STRATAGENE社製、Random primer Biotinylation Kitを用いて作製したビオチン化プローブ0.5μgをハイブリダイズした。尚、トランスファー後、ニトロセルロースメンブレンに行われるベーキングやナイロンメンブレンに行われているUV照射という操作は、本カルボジイミド化合物コートメンブレンに対しては行われず、直ちにハイブリダイゼーションの操作に移行した。さらに、検出は、STRATAGENE社製、Flash(登録商標) Detection Systemにより行った。その結果、アガロース電気泳動により分画されたフラグメントの電気泳動パターン通りのシグナルが、X線フィルムで検出された。

【0071】比較例1~15

カルボジイミド化合物を用いない他は各々実施例1~15と同様に処理して比較例とした。結果は表1、2の「未被覆」の項に示す。

【0072】比較例17(従来法によるDNAの検出)
(従来法であるグルタルアルデヒドを用いた修飾DNAの化学結合による固定化の実)

ファージベクターM13mp18のlac'Z領域中のマルチクローニングサイトの中から29baseを選定し、DNA合成機(MILLIPORE社製、Cyclone Plus DNA/RNA Synthesizer)により、以下の塩基配列のDNAを合成した。この合成DNAの3'末端から2番目の配列の位置には、選択的にストレプトアビジナルカリホスファターゼコンジュゲートタンパクを結合するために、ビオチンフォスフォルアミダイト(MILLIPORE社製)を、5'末端には、アミノリンカー(MILLIPORE社製)を組み込んだ。尚、ビオチンフォスフォルアミダイトは、Bでアミノリンカーは、H2N-で示した。

塩基配列2

5' H2N-GAG GAT CCC CGG GTA
CCG AGC TCG AAT TBC 3'

【0073】ポリスチレン製マイクロプレート(SUMILON ELISA用96FプレートType A(住友ベークライト社製、表面はアミノ基)の5穴に2%グルタルアルデヒド(電子顕微鏡グレード)溶液(2%グルタルアルデヒド/PBS緩衝溶液(pH7.4))を0.1mlずつ分注し、室温で2時間放置した。水で2回洗浄後、アミノリンカー修飾-ビオチン標識DNAオリゴマー溶液(上記

塩基配列 2 の 10 pmol/ml 濃度水溶液溶液) 0.1 ml を 2% グルタルアルデヒド処理ウェル 5 穴 (試料番号 1~5) に分注し、37℃ で 2 時間固定した。検出は上記実施例 1 で行った方法と同様の方法で行った。結

果を表 1 に示す。

【0074】

【表 1】

実施例 及び 比較例	カルボジイミド 化合物溶液	基材	固定物質	吸光度 (Abs.)	
				被覆	未被覆
1	1	PS 製 マイクロプレート	DNA	44.1 ±0.7	0.49 ±0.04
2	1	PS 製 マイクロプレート	酵素-抗体	10.9*1 ±0.9	0.67*2 ±0.08
3	5, 7~9	PS 製 マイクロプレート	DNA	30.7 ±0.5	0.49 ±0.02
4	5, 7~9	PS 製 マイクロプレート	酵素-抗体	10.6 ±0.4	0.62 ±0.07
5	1	PS 製 マイクロプレート	ペプチド (ホルモン)	5.07 ±0.03	0.97 ±0.03
6	1~4, 6, 10~13	PS 製ビーズ	DNA	100	1.5
7	1~4, 6, 10~13	PS 製ビーズ	酵素-抗体	55.5	0.5
17		PS 製 マイクロプレート	DNA		2.61 ±1.36

*1 黄色を呈する *2 無色

【表 2】

実施例 及び 比較例	カルボジイミド 溶液	基材	固定物質	発色結果	
				被覆	未被覆
8	1~4, 6, 10~13	PET フィルム	DNA	○	×
9	1~4, 6, 10~13	PET フィルム	酵素-抗体	○	×
10	1~4, 6, 10~13	ガラス板	DNA	○	×
11	1~4, 6, 10~13	ガラス板	酵素-抗体	○	×
12	1~4, 6, 10~13	銅板	DNA	○	×
13	1~4, 6, 10~13	銅板	酵素-抗体	○	×
14	1~4, 6, 10~13	濾紙	DNA	○	×
15	1~4, 6, 10~13	濾紙	酵素-抗体	○	×

○：発色を検出 ×：発色を検出せず

【0075】

【発明の効果】上記表 1 及び表 2 から明らかなように、本発明は、容易に生物学的に活性物質を固定することが

でき、取り扱いも簡単な材料、及び、容易に生物学的に活性物質を固定するための方法を提供する優れたものといえることができる。

【手続補正書】

【提出日】平成 6 年 8 月 23 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正内容】

【0004】又、核酸では、

1. 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定

(P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, Biochem. J., 278, 735-740 (1991) 参照) 等のような修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法
(尚、この範疇に属する他の方法については、Soren R. R, Mette R. L, Svend E. R, Anal. Biochem., 198, 138-142 (1991), Jonathan N. K, Joseph L. W, Joseph P. D, Rachel E. M, Mary C, Eugene L. B, Nucleic Acids Res., 15, 2891-2909 (1987), Allan J. M, Jeffrey R. B, Terence W. P, Biochem. J., 191, 276-279 (1990) J. A, Running, M. S. Ureda, Biotechniques, 8, 276-279 (1990) 等に記載されている。)

2. ニトロセルロース又はナイロン膜上に UV 照射或いは加熱処理により核酸を吸着固定 (J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2. 109-2. 113 and page 9. 36-9. 46) したり、マイクロプレート上に物理吸着させて固定 (G. C. N. Parry, A. D. B. Malcolm, Biochem. Soc. Trans., 17, 230-231 (1989)) する等の物理吸着で固定する方法

等が知られている。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正内容】

【0060】実施例 9

(1) PET 上へのストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートの固定
実施例 8 と同様の方法でカルボジイミド化合物溶液 1~4、6、10~13 を被覆したフィルムに、ストレプト

アビジンアルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (125 pg/ml Streptavidin-Alkaline Phosphatase conjugate (CLONTECH 製/0.2M Tris HCl, 0.05% Triton-X-100) をカルボジイミド化合物で被覆したフィルムと被覆処理を施していないフィルム (ブランク) におおの 3 ドットずつプロットし、室温で 10 分間固定した。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正内容】

【0062】実施例 10

(1) ガラス上への DNA オリゴマーの固定

実施例 8 と同様の方法でガラス表面にカルボジイミド化合物溶液 1~4、6、10~13 を被覆し、実施例 8 と同様の方法により DNA を固定した。

(2) 検出

実施例 8 と同様の方法により固定 DNA を検出した。結果を表 2 に示す。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正内容】

【0063】実施例 11

(1) ガラス上へのストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートの固定

実施例 8 と同様の方法でガラス表面に 10% カルボジイミド化合物溶液 1~4、6、10~13 を被覆し、実施例 9 と同様の方法によりストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを固定した。

(2) 検出

実施例 9 と同様の方法により固定ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを検出した。結果を表 2 に示す。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正内容】

【0064】実施例 12

(1) 銅板上への DNA オリゴマーの固定

実施例 8 と同様の方法で銅板表面に 10% カルボジイミド化合物溶液 1~4、6、10~13 を被覆し、実施例 8 と同様の方法により DNA を固定した。

(2) 検出

実施例 8 と同様の方法により固定 DNA を検出した。結

果を表 2 に示す。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】実施例 13

(1) 銅板上へのストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートの固定

実施例 8 と同様の方法で銅板表面に 10 % カルボジイミド化合物溶液 1 ~ 4、6、10 ~ 13 を被覆し、実施例 9 と同様の方法によりストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを固定した。

(2) 検出

実施例 9 と同様の方法により固定ストレプトアビジンアルカリホスファターゼコンジュゲートを検出した。結果を表 2 に示す。

【手続補正書】

【提出日】平成 7 年 8 月 23 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のような従来方法には難点のあることが指摘されていた。例えば、化学結合による方法では、特殊試薬が必要で、それらの中には、例えばアジド、イソシアネートや NaBH_2CN 等のような有毒物質が含まれるばかりか、例えばペプチド結合を介して固定化しようとする場合は、活性物質或いは基材のどちらか一方にアミノ基を、残る片方にはカルボキシル基を導入する必要がある、更に、導入された官能基同士を縮合試薬で処理して固定化する行程を経なければならないというように、操作が複雑となることを避けられない。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】上記基材の形状としては、例えば、フィルム、板、粒子、成型品（ビーズ、ストリップ、マルチウエルプレートやそのウエル、組立式マルチウエルプレートの個々の単位、マルチウエルプレートのストリップウエル、チューブ、メッシュ、発泡フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライド及び細胞培養容器）を挙げることができ、又、その大きさについては、当然であるが特に制限はない。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】又、容易に類推されることであるが、この他にも末端封止剤としては、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CO}$

OH 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{NH}$ アルキル末端を有する化合物約 1 モルと、芳香族ジイソシアネート 2 モルとの反応によって簡便に製造できるイソシアネート末端化合物から誘導されるものでもよい。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】(2) 検出

洗浄液 1 (0.2 M NaCl / 0.1 M Tris HCl , 0.05 % Triton-X-100) 0.3 ml で 10 分づつ 3 回洗浄し、更に、洗浄液 2 (0.1 M NaCl / 0.1 M Tris HCl , pH 9.5 / 50 ml MgCl_2) 0.3 ml で 1 回洗浄した後、基質溶液 (1 mg $p\text{-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate}$ / 0.1 M NaCl / 0.1 M Tris HCl , pH 9.5 / 50 ml MgCl_2) 0.1 ml を加え、室温で 2 時間発色反応させた。2 時間経過後、各ウェルについて視覚による発色判定を行うと共に、各ウェル中の溶液の吸光度を分光光度計を用いて測定した。その結果を表 1 に示す。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正内容】

【0072】比較例 17 (従来法による DNA の検出) (従来法であるグルタルアルデヒドを用いた修飾 DNA の化学結合による固定化の例)

ファージベクター M13mp18 の lac' Z 領域中のマルチクロニングサイトの中から 29 base を選定し、DNA 合成機 (MILLIPORE 社製、Cyclone Plus DNA/RNA Synthesizer) により、以下の塩基配列の DNA を合成した。この合成 DNA の 3' 末端から 2 番目の配列の位置には、選択的にストレプトアビジンアルカリホスファターゼコ

ンジュゲートタンパクを結合するために、ビオチンフォスフォルアミダイト (MILLIPORE社製) を、
5' 末端には、アミノリンカー (MILLIPORE社製) 組み込んだ。尚、ビオチンフォスフォルアミダイト

はBで、アミノリンカーはH₂N-で示した。

塩基配列 2

5' H₂N-GAG GAT CCC CGG GTA
CCG AGC TCG AAT TBC 3'

フロントページの続き

(72) 発明者 今城 靖雄

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 高橋 郁夫

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 佐々木 直一

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 荘司 友聡

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 松林 裕子

東京都足立区西新井栄町 1-18-1 日
清紡績株式会社東京研究センター内

THIS PAGE BLANK (USPTO)